

明細書

アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド

技術分野

本発明は、アンジオテンシン変換酵素（以下、ACEとも略記する）阻害活性を有するペプチドに関する。更に詳しくは、血圧降下剤として、医薬品に使用するほか、血圧が高い人用の特別用途食品、栄養食品、機能性食品、特定保健用食品、血圧降下作用を標榜可能な飲食品等として使用し、血圧上昇抑制のほか、高血圧の予防等に広く利用可能なACE阻害活性を有するペプチドに関する。

背景技術

ACEは、血圧や体液量調節に重要な役割を果たしているタンパク質分解酵素で、血圧上昇を調節するレニン-アンジオテンシン系でアンジオテンシンIを強い昇圧作用のあるアンジオテンシンIIに変換する作用を有する。当該酵素の阻害剤については様々な研究がなされており、血圧を低下させる作用があることが知られている(D.W. Cushman *et al.*, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 20, Pages 1637-1648(1971), Robert J. L. *et al.*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 204, Pages 281-288(1977))。ACE阻害剤としては種々の薬剤が研究され、市販されている(金子 好宏他、「医学のあゆみ」第122巻、62-85ページ、1972年、久代 登志男他、「一目でわかる高血圧」第2版、54-55ページ、1998年、戸田 昇他、「循環系治療薬の作用メカニズム」、260-267ページ、1998年)。また、カゼインやゼラチン、イワシ、カツオ等の様々な食品からACE阻害ペプチドが見出されている。例えば、カゼイン由来のペプチドVPP (Val-Pro-Pro, IC_{50} 値 $9\mu M$)、IPP (Ile-Pro-Pro, IC_{50} 値 $5\mu M$)、VAP (Val-Ala-Pro, IC_{50} 値 $2\mu M$)、トウモロコシタンパク質 α -ゼイン由来LQP (Leu-Gln-Pro, IC_{50} 値 $2\mu M$) が知られている(Yasunori Nakamura *et al.*, *Journal of Dairy Science*, Vol. 78, Pages 777-783 (1995), Shinsuke Miyoshi *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 55 (5) Pages 1313-1318 (1991)、Susumu Maruyama *et al.*, *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 51 (6), Pages 1581-1586(1987))。

発明の開示

上記のように、ACE阻害剤の研究、開発がさかんに行われている技術の現状に鑑み、本発明者らは、従来にない全く新規にして効果を有するACE阻害剤の開発を行うこととした。

本発明者らは、上記課題を解決するために各方面から検討の結果、ペプチド、特にオリゴペプチドに着目して数多くのペプチドを合成し、得られたペプチドについてスクリーニングを行った。その結果、ACE阻害作用にすぐれたペプチドを

発見し、in vitro試験を行った結果、これらのペプチドが血圧降下剤として使用できることを確認して、本発明を完成した。

本発明は、以下の(1)～(9)に関する。

(1) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号1で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号2で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。

(3) 配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号3で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。

(4) (1)～(3)のいずれか1項に記載のペプチドを有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

(5) (1)～(3)のいずれか1項に記載のペプチドを含有する飲食品。

(6) (1)～(3)のいずれか1項に記載のペプチドを有効成分として含有する医薬。

(7) アンジオテンシン変換酵素の異常に起因する疾患の予防および／または治療剤である、(6)記載の医薬。

(8) アンジオテンシン変換酵素阻害剤を製造するための、(1)～(3)のいずれか1項に記載のペプチドの使用。

(9) アンジオテンシン変換酵素の異常に起因する疾患の予防および／または治療剤を製造するための、(1)～(3)のいずれか1項に記載のペプチドの使用。

図面の簡単な説明

図1は、チーズ由来ペプチドのHPLCクロマトグラムを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のペプチドとして、具体的には以下の(a)～(f)のペプチドが挙げられる。

- (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- (b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- (c) 配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、
- (d) 配列番号1で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつACE阻害活性を有するペプチド、
- (e) 配列番号2で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつACE阻害活性を有するペプチド、
- (f) 配列番号3で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつACE阻害活性を有するペプチド。

以下、配列番号1で表されるアミノ酸配列(Met-Ala-Pro)からなるペプチド、

配列番号2で表されるアミノ酸配列 (Ile-His-Ala) からなるペプチド、および配列番号3で表されるアミノ酸配列 (Ile-Gln-Ala) からなるペプチドを、それぞれ MAP、IHA、および IQA とともに略記する。

配列番号1～3で表されるアミノ酸配列に1以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ ACE 阻害活性を有するペプチドにおいて、付加されるアミノ酸としては特に限定されず、ACE 阻害活性を有する限り任意のアミノ酸を用いることができる。付加されるアミノ酸の数としては特に限定されず、ACE 阻害活性を有する限り、任意の数のアミノ酸を用いることができるが、一般に、1～10個、好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個、特に好ましくは1個のアミノ酸が付加される。

具体的には、配列番号4で表されるアミノ酸配列 (Leu-Met-Ala-Pro) からなるペプチド、配列番号5で表されるアミノ酸配列 (Arg-Met-Ala-Pro) からなるペプチド、配列番号6で表されるアミノ酸配列 (Met-Ala-Pro-Pro) からなるペプチド、配列番号7で表されるアミノ酸配列 (Arg-Met-Ala-Pro-Pro) からなるペプチド等が挙げられる。

本発明のペプチドは、塩酸塩、酢酸塩、硫酸塩、コハク酸塩、酒石酸等の工業上使用される塩を付加したペプチドであってもよいが、食品上または医薬上許容される塩が付加されていることが好ましい。

本発明のペプチドは、単独もしくは2以上のペプチドの混合物として使用することができる。

本発明のペプチドは、公知のペプチド合成法により製造されても良いし、カゼイン等の乳タンパク質を酵素若しくは化学的に加水分解することによって調製されても良い。また、微生物発酵を利用しても良い。

本発明の ACE 阻害剤は、本発明のペプチドを含んでいればよく、飲食品又特定保健用食品、栄養機能食品、特別用途食品、健康食品、医薬部外品、医薬品いずれの形態でも利用することができ、例えば、医薬品または医薬部外品として直接投与することにより、或いは健康食品、特定保健用食品等の特別用途食品、栄養機能食品として直接摂取することにより、あるいはまた、各種食品（牛乳、清涼飲料、発酵乳、ヨーグルト、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァ、クラストその他）に添加しておき、これを摂取してもよい。

前記食品を製造するために、主成分として、水やタンパク質、糖質、脂質、ビタミン及びミネラル類、有機酸、果汁、フレーバー類等を組み合わせることができる。例えば、全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動植物性タンパク質、これら加水分解物、バター、乳清ミネラル、クリーム、ホエイ、乳清ミネラル、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分、蔗糖、ブドウ糖、果糖、糖アルコール類、麦芽糖、オリゴ糖類、化工澱粉（デキストリンのほか、ソリュブルスターチ、ブリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等）、食物繊維等の炭水化物、ラード、魚油などの動物性油脂、パ

ーム油、サフワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油等の植物性油脂、これらの分別油、水添油、エステル交換油等の植物性油脂、ビタミンA、ビタミンB群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニコチン酸、パントテン酸、ビオチン、イノシット、コリン、葉酸などの各種ビタミン、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、塩素、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレン、フッ素、ケイ素、ヨウ素等のミネラル、リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸等の有機酸や有機酸塩などが挙げられ、これらから選択される1種又は2種以上を適宜選択して添加することができる。これら各種成分は合成品の他、必要に応じこれらを多く含む食品で添加することも望ましい。

本発明品を医薬品または医薬部外品として使用する場合には、種々の塩として投与することができる。例えば、塩酸、酢酸、蟻酸等の塩による投与を挙げることができる。投与経路は、経口、経皮、経腸、経管、静脈注射、筋肉注射、点鼻、点眼、吸入投与、直腸投与等を用いる事ができる。また種々の形態で投与することができ、その形態として、例えば、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、水剤等による投与を挙げることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主剤に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤、矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。

本発明のペプチドは、ACE阻害活性を有するので、レニン-アンジオテンシン系やキニン-カリクレイン系等のACEに関連する疾患の予防および/または治療に用いることができる。ACEに関連する疾患としては、高血圧症、動脈硬化、血管肥厚、心筋梗塞、心不全、心肥大、腎不全、糖尿病等が挙げられる。

本発明に係る有効成分は、毒性は全くないか又は極めて低く、卓越した安全性を示し、マウスに対して1日当り500mg経口投与したが急性毒性は全く認められなかった。したがって飲食品として使用する場合は、予防用、保健用、飲食品として使用する場合のいずれにおいても有効成分の使用量に格別の限定はなく、医薬品として使用する場合でも、患者に応じて上記範囲内で適宜使用すればよい。例えば、経口摂取の場合、その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して1日約0.1mg乃至1,500mgを一回もしくは数回に分けて投与することができる。また、本有効成分は多量に服用しても格別の急性毒性を示さないので、必要あれば上記範囲よりも多量に使用しても差し支えない。

以下、本発明のペプチドの製造方法を、MAPを例に挙げて説明する。IHA、IQAおよびこれらペプチドを部分ペプチドとして含有するペプチドも同様に製造することができる。

1. MAPの調製方法

MAPは好ましくは以下の方法で調製可能である。

以下の調製方法において、MAPを部分構造に含む基質と基質からMAPを切り出

すような酵素の組み合わせが用いられる。基質としては、 β -カゼインが好ましくは用いられるが、他に乳または乳由来の成分、全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質、豆類や小麦等の動植物性タンパク質およびこれらの加水分解物であっても良い。 β -カゼインはプロリンに富み、配列中の約17%をプロリンで占める。また、ミルクカゼインミセル中に33.6%含まれており大量に調製することができる。

基質を0.1~70重量%、好ましくは0.1~60重量%、さらに好ましくは0.3~50重量%の濃度で水に溶解する。プロテアーゼN「アミノ」G（天野エンザイム株式会社製）を基質蛋白含量に対して0.1~10重量%、好ましくは0.3~2重量%添加し、クエン酸溶液、乳酸、塩酸等の有機酸および無機酸を用いて、pHを4.5~6.0、好ましくは4.5~5.0に調整し、攪拌しながら15~50℃、好ましくは20~40℃、さらに好ましくは30~40℃で分解する。40~50時間の分解後、ウミザイムG（天野エンザイム株式会社製）、Flavourzyme（Novozymes Corporation製）を基質蛋白含量に対してそれぞれ0.01~10重量%、好ましくは0.1~5重量%添加し、pHを3.5~5.0、好ましくは3.5~4.0に調整する。15~50℃、好ましくは20~40℃、さらに好ましくは30~40℃で攪拌しながらさらに5-10日間分解する。50~110℃、好ましくは60~100℃、さらに好ましくは80~100℃で10分~20分の加熱処理により酵素を失活させ、pHを4.5~6.0、好ましくは4.5~5.0に調整する。

2. MAPの生成確認法

MAPの生成確認方法は、酵素消化サンプルの水溶性画分とMAP標準品をそれぞれLC-MSにて分析し、MAP標準品のMAPと同様の保持時間におけるピークの有無によって判断する。前記1.で調製した酵素消化サンプルを10,000g、40分で4℃にて遠心分離し、水溶性画分を回収し、さらに凍結乾燥する。凍結乾燥物を下記移動相で再溶解して100 μ g/mLとし、この5 μ Lをインジェクションする。MAP標準品は下記移動相で溶解して5 μ g/mLとし、この5 μ Lをインジェクションする。MAP標準品を下記の分析条件にて分析すると、保持時間約17分にMAPのピークが観察される。同様の分析条件で酵素消化サンプル水溶性画分を分析する時、約17分にピークが観察されたサンプルを「MAPあり」、ピークが観察されないサンプルを「MAPなし」と判断する。

カラム：CAPCEL PAK C18 MG(ϕ 2.0 \times 250mm, 資生堂製)

移動相：0.05%ギ酸を含む4%アセトニトリル溶液

流速：0.17ml/min.

カラム温度：40℃

検出器：ESI positive

分子量：318

以下、実施例を挙げ本発明をさらに詳述するが、これらは本発明を限定するも

のではない。

実施例 1

Denmark Skimチーズ（ミートチョパーにて粉碎）100gと滅菌水50gを混合し、スターター菌18g（*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris*, および*Lactococcus diacetylactis*の3種）および食塩0.34g添加し攪拌後、プロテアーゼN「アマノ」G（天野エンザイム社製）を0.6g添加し、34℃で振とうすることにより分解を行った。48時間後、クエン酸にてpH 4.1に調整し、ウマミザイムG（天野エンザイム社製）および Flavourzyme (Novozymes Corporation)をそれぞれ0.3g添加し、34℃で振とうすることにより分解を行った。6日後、NaOHでpHを7.0に調整し、滅菌水を添加して200gにした。110℃で15分加熱して酵素を失活させた。遠心分離により不溶物を除去した後、HPLCによりペプチドの精製を行った。YMC-Pack R&D ODSカラム (YMC社製、20×250mm)を用いて0.1%トリフルオロ酢酸水溶液から0.1%トリフルオロ酢酸を含む70%アセトニトリル水溶液へのリニアグラジエント (50分)により溶出させた (流速7.5mL/分、検出214nm、カラム温度40℃)。HPLCクロマトグラムを図1に示す。27～31分に溶出したD画分を分取し、同様のカラムクロマトによる精製を行い、Met-Ala-Pro, Ile-His-Ala, Ile-Gln-Alaの配列を有するトリペプチドが単離された。

実施例 2

ペプチド自動合成機を用いて配列番号1～7のペプチドをそれぞれ合成した。得られたペプチドの純度は、逆相HPLCで95%であることが、それぞれ確認された。これらの合成ペプチドを0.1Mホウ酸バッファ (pH 8.3) で溶解する。次に、酵素液 (Angiotensin Converting Enzyme: 2unit/ml) 0.1mlとサンプル溶液0.04mlを混合し、37℃に加温する。基質液 (Hippuryl-His-Leu; N-Benzoyl-Gly-His-Leu) 0.1mlを添加し、よく攪拌する。37℃で60分間反応させた後、1N塩酸を0.13ml添加して反応を停止させた。酢酸エチル0.85mlを加えて1分間振とうした後、3,000rpmで10分間遠心分離させた。上清0.7mlを回収して遠心エバポレーターにて溶媒を除去する (約30分間)。蒸留水0.5mlを加えて残留物を溶解し、波長228nmにおける吸光度を測定した。

以下の数式1によりACE阻害活性 (%) を求めた。

数式 1

$$\text{ACE阻害活性 (\%)} = \{(A-B) - (C-D)\} / (A-B) \times 100$$

ここで、式中Aは酵素を用いた場合における対照の吸光度、Bは酵素を用いなかった場合における対照の吸光度、Cは酵素を用いた場合におけるサンプルの吸光度、Dは酵素を用いなかった場合におけるサンプルの吸光度である。また、対照

にはサンプル液の代わりに0.1Mホウ酸バッファを用いた。

得られたACE阻害活性に基づき、各ペプチドの IC_{50} 値を算出した。結果を以下の表に示す。

表 1

	IC_{50} 値
Met-Ala-Pro	$0.8 \mu M$
Ile-His-Ala	$394.3 \mu M$
Ile-Gln-Ala	$64.1 \mu M$

上記結果から明らかなように、3種類のペプチドは、いずれも、高いACE阻害作用を発現することが確認された。これらの中でも、ペプチドMAP (Met-Ala-Pro) は特に高い阻害活性を示した。

実施例 3

実施例 2 と同様の方法で、Met-Ala-Proを部分構造的に有するLeu-Met-Ala-Pro、Arg-Met-Ala-Pro、Met-Ala-Pro-ProおよびArg-Met-Ala-Pro-Proの4つのペプチドについて、ACE阻害活性 (%) を求め、 IC_{50} 値を算出した。

結果を表 2 に示す。

表 2

	IC_{50} 値
Leu-Met-Ala-Pro	$27.9 \mu M$
Arg-Met-Ala-Pro	$24.0 \mu M$
Met-Ala-Pro-Pro	$28.3 \mu M$
Arg-Met-Ala-Pro-Pro	$254.9 \mu M$

上記結果より、ペプチドMAPを部分構造として有するペプチドは、いずれも高いACE阻害活性を示すことが明らかとなった。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2003 年 12 月 1 日出願の日本特許出願 (特願 2003-401405) に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

本発明のペプチドは、ACE阻害活性がきわめて高いので、少ない容量で血圧上昇抑制効果を発揮することができ、血圧上昇抑制のための予防ないし治療剤として有用であるだけでなく、強い苦味等不快な風味も認められず、血圧上昇抑制用の予防ないし治療用飲食品としても利用することができる。

配列表フリーテキスト

配列番号1-人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号2-人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号3-人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号4-人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号5-人工配列の説明：合成ペプチド

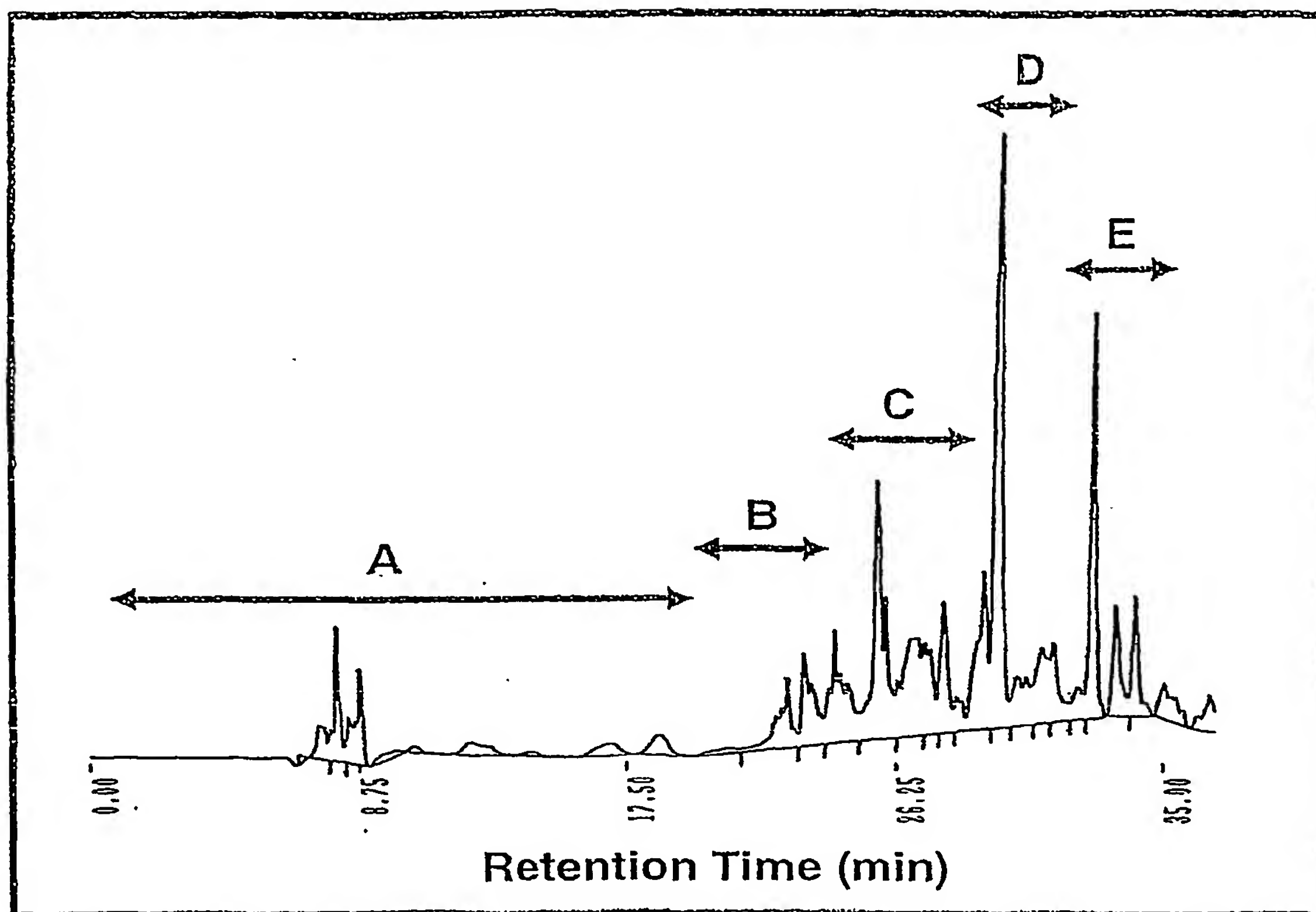
配列番号6-人工配列の説明：合成ペプチド

配列番号7-人工配列の説明：合成ペプチド

請求の範囲

1. 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号 1 で表されるアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。
2. 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号 2 で表されるアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。
3. 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、または配列番号 3 で表されるアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。
4. 請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含有するアンジオテンシン変換酵素阻害剤。
5. 請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含有する飲食品。
6. 請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含有する医薬。
7. アンジオテンシン変換酵素の異常に起因する疾患の予防および／または治療剤である、請求の範囲 6 に記載の医薬。
8. アンジオテンシン変換酵素阻害剤を製造するための、請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。
9. アンジオテンシン変換酵素の異常に起因する疾患の予防および／または治療剤を製造するための、請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Dairies Corporation

<120> Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides

<130> P50783

<150> JP2003-401405

<151> 2003-12-01

<160> 7

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 1

Met Ala Pro

1

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 2

Ile His Ala

1

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 3
Ile Gln Ala
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4
Leu Met Ala Pro
1

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5
Arg Met Ala Pro
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6

Met Ala Pro Pro

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

Arg Met Ala Pro Pro

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K5/083, A61K38/06, A61P9/12, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K5/083, A61K38/06, A61P9/12, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2003-511063 A (Saint Louis University), 25 March, 2003 (25.03.03), Claim 4 & WO 01/27242 A2 & US 6261794 B1 & CA 2387126 A & AU 2001021130 A5 & EP 1221954 A2	1/2-9
Y	JP 6-279491 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94), Full text (Family: none)	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 March, 2005 (21.03.05)Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018235

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-277090 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94), Full text (Family: none)	1-9
Y	JP 6-277091 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 04 October, 1994 (04.10.94), Full text (Family: none)	1-9
Y	JP 7-101982 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 18 April, 1995 (18.04.95), Full text (Family: none)	1-9
Y	JP 2002-121199 A (Kabushiki Kaisha Shimaya), 23 April, 2002 (23.04.02), Full text (Family: none)	1-9
A	MINERVINT F. et al., Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl.Environ.Microbiol. (2003.09), Vol.69, No.9, pages 5297 to 5305	1-9
A	Shoji KANEKO et al., "Tofu Seizo ni Okeru Koso Riyo ni Kansuru Kenkyu (Dai 3 Ho) Koso Shori ni yoru Kinosei Koka ni tsuite", Research report of Food Technology Research Institute of Nagano Prefecture, 01 September, 2003 (01.09.03), No.31; pages 53 to 56	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C07K 5/083, A61K 38/06, A61P 9/12, A61P 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C07K 5/083, A61K 38/06, A61P 9/12, A61P 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 2003-511063 A (セント ルイス ユニバーシティ) 2003.03.25, 特許請求の範囲第4項等 & WO 01/27242 A2 & US 6261794 B1 & CA 2387126 A & AU 2001021130 A5 & EP 1221954 A2	1/2-9
Y	JP 6-279491 A (日本合成化学工業株式会社) 1994.10.04, 全文 (ファミリーなし)	1-9
Y	JP 6-277090 A (日本合成化学工業株式会社) 1994.10.04, 全文 (ファミリーなし)	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
21.03.2005

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
左海 匡子

4N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 6-277091 A (日本合成化学工業株式会社) 1994. 10. 04, 全文 (ファミリーなし)	1 - 9
Y	JP 7-101982 A (日本合成化学工業株式会社) 1995. 04. 18, 全文 (ファミリーなし)	1 - 9
Y	JP 2002-121199 A (株式会社シマヤ) 2002. 04. 23, 全文 (ファミリーなし)	1 - 9
A	MINERVINI F, et al., Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl Environ Microbiol. (2003. 09) Vol. 69, No. 9, p. 5297-5305	1 - 9
A	金子昌二ほか、豆腐製造における酵素利用に関する研究(第3報)酵素 処理による機能性効果について 長野県食品工業試験場研究報告(2003/09/01)NO. 31; PAGE. 53-56	1 - 9